

2014

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA

ZAKLJUČNA NALOGA
DOKAZOVANJE VIRUSA LIMFOCITNEGA
HORIOMENINGITISA PRI MALIH SESALCIH
VZORČENIH NA DIVJIH ODLAGALIŠČIH V ISTRI

SANDRA HASIĆ

HASIĆ

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Dokazovanje virusa limfocitnega horiomeningitisa pri malih sesalcih
vzorčenih na divjih odlagališčih v Istri**

(The detection of lymphocytic choriomeningitis virus sampled on illegal waste sites in
Istria peninsula)

Ime in priimek: Sandra Hasić
Študijski program: Biodiverziteta
Mentor: izr. prof. dr. Elena Varljen Bužan
Somentor: asist. dr. Darja Duh

Koper, september 2014

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Sandra HASIĆ

Naslov zaključne naloge: Dokazovanje virusa limfocitnega horiomeningitisa pri malih sesalcih vzorčenih na divjih odlagališčih v Istri

Kraj: Koper

Leto: 2014

Število listov: 44

Število slik: 13

Število preglednic: 3

Število prilog: 2

Št.strani prilog: 5

Število referenc: 41

Mentor: izr. prof. dr. Elena Varljen Bužan

Somentor: asist. dr. Darja Duh

Ključne besede: Istrski polotok, divja odlagališča, mali sesalci, LCMV

Izvleček:

Z zaključno nalogo smo želeli ugotovi prisotnost in razširjenost virusa limfocitnega horiomeningitisa (LCMV) pri malih sesalcih na območju divjih odlagališč slovenske in hrvaške Istre. Skupno smo analizirali 83 vzorcev iz različnih vzorčnih mest. Za vsako državo smo določili 3 glavna vzorčna mesta (kjer je bilo največje število vzorčnih organizmov). Vsi izbrani vzorci malih sesalcev iz rodu *Mus* sp. in *Apodemus* sp. so bili analizirani z metodo posredne imunofluorescence, 46 vzorcev pa tudi z molekularno metodo. Po serološkem testiranju smo ugotovili, da je virus občutno bolj prisoten pri vrsti *Mus musculus* (47% pozitivnih vzorcev), ki je naravni rezervoar LCMV, kot pri preostalih dveh vrstah iz rodu *Apodemus* (16 % pozitivnih vzorcev). Ugotovili smo, da je LCMV bolj prisoten pri glodavcih, katerih habitat so predstavljala divja odlagališča (33,3% v Sloveniji in 39% na Hrvaškem), medtem ko je bila pri vzorcih iz naravnega okolja seroprevalenca med 6,7% na hrvaškem in 9,1% na slovenskem delu Istre.

Glede na rezultate lahko sklepamo, da divja odlagališča predstavljajo potencialno nevarnost za zdravje ljudi tudi s stališča mikrobiološkega tveganja. Njihov obstoj v bližini urbanih naselij lahko poveča prenos patogenov iz gostiteljev na človeka, zato bi bila sanacija takšnih območij nujna.

Key words documentation

Name and SURNAME: Sandra HASIĆ

Title of the final project: The detection of lymphocytic choriomeningitis virus sampled on illegal waste sites in Istria peninsula

Place: Koper

Year: 2014

Number of pages: 44

Number of figures:13

Number of tables:3

Number of appendix: 2

Number of appendix pages: 5

Number of references: 41

Mentor: Assoc. Prof. Elena Varljen Bužan, PhD

Co-Mentor: Assist. Darja Duh, PhD

Keywords: Istra peninsula, illegal waste sites, small mammals, LCMV

Abstract:

The aim of the final project was to determine the presence and prevalence of Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) in small mammals sampled at illegal waste sites the Slovenian and Croatian part of Istra Peninsula. A total of 83 samples were analyzed. For each country we set 3 main sample sites (where it was the largest number of model organisms). All selected samples of small mammals belonged to the *Mus* sp. genus or *Apodemus* sp. genus. All samples were analysed by the method of immunofluorescence assay. In addition 46 samples were as well analyzed with the molecular method (RT-PCR). With serological testing completed we could observe that the virus was significantly more present in LCMV natural reservoir *Mus musculus* (47% of positive samples) than in the other two species of genus *Apodemus* (16% of positive samples). The results show higher seroprevalence in samples that were collected at illegal waste sites (33.3% in Slovenia and 39% in Croatia) than those from their from the natural environment (between 6,7% and 9,1 %). According to the results we can conclude that the waste sites pose a potential risk for people's health from the standpoint of microbiological risks. Their existence in the vicinity of urban settlements can increase the transmission of pathogens from hosts to man, so remediation of such sites and thus prevention against contamination risks should be of highest importance.

ZAHVALA

Zaključno delo je obsežen projekt, ki ga sama ne bi mogla izpeljati. Zatorej se zahvaljujem vsem, ki ste mi pri mojem delu kakorkoli pomagali predvsem pa:

Mentoricama dr. Darji Duh in izr. prof. dr. Eleni Varljen Bužan, za vse podane izkušnje ter tako pedagoško kot tudi strokovno svetovanje pri nastajanju dela, predvsem pa za prelito navdušenje nad znanostjo in ponujeno priložnost, da se lahko učim od najboljših.

Dr. Remi Charrellu iz Universite de la Mediterranee za podarjena objektna stekelca z nanešenim antigenom in za pozitivne kontrole.

Nacionalnemu laboratoriju za zdravje, okolje in hrano v Mariboru, ki mi je omogočil uporabo njihovih prostorov in potrebnega materiala za izvedbo diplomske naloge.

Znanstveno-raziskovalnemu središču Koper, Inštitututu za biodiverzitetne študije, ki mi je omogočil sodelovanje pri mednarodnem projektu DIVA- Sanacija divjih odlagališč in, ki je kril večji del nastalih stroškov za uporabljen laboratorijski material.

Petru Maričiću dr. vet. med., ki je opravil levji delež terenskega dela in strokovno izvedel odvzem tkivnih kultur.

Zahvala gre tudi ostalim raziskovalcem Inštituta za biodiverzitetne študije in študentom Biodiverzitete (UP FAMNIT), ki so sodelovali pri projektu DIVA.

Predvsem pa gre ena velika zahvala celi moji družini, še posebej sestri Amri in Mateju, ki so mi že toliko krat stali ob strani in mi nudili tako finančno, kot moralno podporo v času študija. Hvala ker verjamete vame.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD.....	1
1. 1 Divja odlagališča.....	2
1. 1. 1 Negativni vplivi divjih odlagališč	2
1. 1. 2 Problematika divjih odlagališč	3
1. 1. 3 Zakonodaja	3
1. 1. 4 Civilne iniciative.....	4
1. 2 Virus limfocitnega horiomeningitisa	4
1. 2. 1 Zgodovina.....	4
1. 2. 2 Zgradba.....	5
1. 2. 3 Filogenija.....	6
1. 2. 4 Gostiteljske vrste	7
1. 2. 5 Detekcija virusa v Sloveniji in na Hrvaškem	9
2 METODE DELA	11
2. 1 Terensko delo.....	11
2. 2 Laboratorijsko delo	13
2. 2. 1 Izolacija DNK in RNK.....	13
2. 2. 2 Določevanje vrste z analizo gena za citokrom B	14
2. 2. 3 Dokazovanje prisotnosti LCMV z metodo vgnezdene PCR	14
2. 2. 4 Metoda posredne imunofluorescence.....	17
3 REZULTATI IN DISKUSIJA.....	19
3. 1 Okuženost glede na vrsto	21
3. 2 Okuženost glede na okolje	22
4 ZAKLJUČEK	23
5 LITERATURA	24

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: Priprava PCR reakcijske mešanice za 1 st round PCR.....	15
Tabela 2: Priprava PCR reakcijske mešanice za 2 nd round PCR.....	16
Tabela 3: Okuženost glede na vrsto po metodi IFA	21

KAZALO SLIK

Slika 1: Slika in grafični prikaz strukture LCMV.	5
Slika 2: Filogenetsko nekoreninjeno drevo družine Arenaviridae	6
Slika 3: Glavni gostitelj LCMV-hišna miš	7
Slika 4: Rumenogrla miš, ena naključnih prenašalskih vrst.....	8
Slika 5: Rumenogrla miš (<i>Apodemus sylvaticus</i>)	8
Slika 6: Dimasta miš (<i>Apodemus agrarius</i>)	9
Slika 7: Zemljevid vzorčnih lokalitet.	11
Slika 8: Primer vzorčnega mesta Umag	12
Slika 9: Primer vzorčnega mesta Podgorje	12
Slika 10: Negativna kontrola in pozitivna kontrola.....	19
Slika 11: Določitev pozitivnega vzorca.....	20
Slika 12: Pozitiven PRC produkt.....	20
Slika 13: RNA vzorci dolgi okoli 450 bp 2nd round nPCR	21

KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam divjih odlagališč in referenčnih območij, vključenih v raziskavo na področju Istre	29
Priloga B: Tabela analiziranih vzorcev in rezultatov	31

SEZNAM KRATIC

LCMV: virus limfocitnega horiomeningitisa

RT-PCR: verižna reakcija s polimerazo in reverzno transkriptazo

PCR: verižna reakcija s polimerazo

RNK: ribonukleinska kislina

DNK: deoksiribonukleinska kislina

IFA: metoda posredne imunofluorescence

UV: ultra vijolična

bp: bazni par

rpm: rotations per minute (obradi na minuto)

POVZETEK

Človek s svojim vplivom nemalokrat posega v okolje in s tem v naravne habitate mnogih organizmov. V obdobju naraščanja človeške populacije je vedno bolj pereče vprašanje ravnanja z odpadki in njihov vpliv na okolje. Eden takšnih problemov predstavljajo divja odlagališča. Le ta predstavljajo svojevrsten habitat za razne živalske vrste, med drugimi tudi takšne, ki so lahko prenašalke različnih bolezni (zoonoz), kar pa lahko vpliva tudi na zdravje ljudi (Bužan s sod. 2013).

Z diplomsko nalogo smo želeli ugotovi prisotnost in razširjenost virusa limfocitnega horiomeningitisa pri malih sesalcih na območju divjih odlagališč slovenske in hrvaške Istre.

Virus limfocitnega horiomengitisa (LCMV) je prvi odkrit arenavirus, ki so ga uspeli osamiti in kultivirati. Družino Arenaviridae sestavlja 22 vrst virusov, ki jih delimo na viruse Starega in Novega sveta. LCMV uvrščamo med arenaviruse Starega sveta (Salvato in sod., 2005). Čeprav so geografsko razširjeni po celem svetu, so omejeni na življenjski prostor naravnih gostiteljev. Le LCMV najdemo na vseh celinah zaradi svetovno razširjenega naravnega gostitelja, hišne miši (*Mus musculus*) (Peters in sod., 1996).

Človek se okuži preko neposrednega stika z ugrizom glodavca ali preko kontaminiranega aerosola iz izločkov okuženih glodavcev (Murray in sod., 2007, Emonet in sod., 2007). Pri človeku se okužba izrazi na različne načine; obstaja lažja prehodna oblika s simptomi gripe in težja oblika z meningitisom (Peters in sod. 1995). LCMV je posebej nevaren za nosečnice, pri katerih okužba povzroča poškodbe in nenormalen razvoj plodu (Barton in Mets, 2001).

Gozdni delavci, lovci in kmetje so zaradi narave dela skupina ljudi, ki je bolj izpostavljena za okužbe z arenavirusom LCMV (Kraus in sod., 2003).

V diplomski nalogi smo analizirali skupno 83 vzorcev iz različnih vzorčnih mest. Za vsako državo smo določili 3 glavna vzorčna mesta (kjer je bilo največje število vzorčnih organizmov). Vsi izbrani vzorci so bili analizirani z metodo posredne imunofluorescence, 46 vzorcev pa tudi z molekularno metodo. Po serološkem testiranju smo ugotovili, da je virus občutno bolj prisoten pri vrsti *Mus musculus* (47% pozitivnih vzorcev) kot pri preostalih dveh vrstah iz rodu *Apodemus* (16 % pozitivnih vzorcev). Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je hišna miš kot naravni gostitelj LCMV bolj podvržena k okužbi kot druge sorodne vrste.

Ugotovili smo, da je LCMV bolj prisoten pri glodavcih, katerih habitat so predstavljala divja odlagališča (33,3% v Sloveniji in 39% na Hrvaškem) medtem ko je bila pri vzorcih iz naravnega okolja seroprevalenca med 6,7% na Hrvaškem in 9,1% na Slovenskem delu Istre.

Glede na rezultate lahko sklepamo, da divja odlagališča predstavljajo potencialno nevarnost za zdravje ljudi tudi s stališča mikrobiološkega tveganja. Njihov obstoj v bližini urbanih naselij lahko poveča prenos patogenov iz gostiteljev na človeka, zato bi bila nujna sanacija takšnih območij.

1 UVOD

Divja odlagališča predstavljajo pereč okoljevarstven in naravovarstven problem. Z nenadzorovanim odlaganjem odpadkov ljudje resno posegamo v naravo. Na ta način prinašamo v naravo tujerodne vrste in vrste, ki so lahko prenašalci različnih humanih, zdravju človeka in živali nevarnih patogenov. Posledično torej divja odlagališča predstavljajo veliko nevarnost tudi za javno zdravje (Bužan in sod. 2013).

Virus limfocitnega horiomeningitisa (LCMV) je arenavirus iz družine *Arenaviridae*. Naravni gostitelj virusa so predstavniki družine *Muridae* (miši), najpogosteje je to hišna miš (*Mus musculus*) (Kraus in sod., 2003). Ta vrsta miši je razširjena po celem svetu. Zaradi značilne koevolucije LCMV in gostitelja, razširjenost LCMV sovпада z arealom hišne miši. Virus sicer ni izključno vezan na to vrsto, saj ga najdemo tudi pri predstavnikih drugih družin. Tako so lahko nadomestni gostitelji tudi *Glis glis*, *Apodemus flavicolis*, *Myodes glareolus* itd. Virus se prenaša tako horizontalno kot tudi vertikalno, vendar naj bi le vertikalni prenos zagotavljal kronične nosilce (Gonzalez in sod., 2007; Kraus in sod., 2003).

Areal hišne miši je tesno povezan s človeškim delovanjem in s človeškim habitatom. Zato je možen prenos virusa iz okuženega gostitelja na človeka, kar pomeni, da je LCMV zoonotski agens. Človek se lahko okuži neposredno z ugrizom živali (s slino) ali preko kontaminiranega areosola iz izločkov okuženih glodavcev (feces ali urin) (Bizimoska 2008, Emonet in sod., 2007). Največ težav virus povzroči v nosečnosti, saj lahko vpliva na razvoj zarodka in povzroči trajne deformacije plodu. Bolezen se lahko pojavi v dveh oblikah: blažja oblika ima gripi podobne simptome. Prva faza bolezni se izrazi s povišano telesno temperaturo, utrujenostjo, glavobolom, levkopenijo in trombocitopenijo. Po 3 – 5 dneh vročina pade, vendar se povrne v 2 – 4 dneh z močnejšim glavobolom. V tej drugi fazi lahko bolezen napreduje v meningitis. (Murray in sod., 2007, Emonet in sod., 2007).

V diplomskem delu smo ugotavljali prisotnost LCMV pri ulovljenih glodavcih; hišni miši (*Mus musculus*) in rumenogrli miši (*Apodemus flavicolis*). S terenskim vzorčenjem na divjih odlagališčih v slovenskem in hrvaškem delu Istre smo zbirali osebke za analizo stopnje okuženosti. Z raziskovalnim delom smo želeli potrditi prisotnost LCMV v Istri, ugotoviti, če obstaja korelacija med vrsto in stopnjo okuženosti ter ugotoviti korelacijo med stopnjo okuženosti živali in na divjih odlagališčih in v naravnem okolju.

Hipoteze, ki smo jih postavili so:

1. LCMV je prisoten na območju Istrskega polotoka.
2. Stopnja okuženosti organizmov z LCMV na divjih odlagališčih je večja kot v naravnem okolju.
3. Korelacija med vrsto in stopnjo okuženosti ne obstaja.

1.1 Divja odlagališča

Divja odlagališča odpadkov, so posledica nepravilnega ravnanja z odpadki in so zagotovo primer nepotrebnega obremenjevanja okolja, pri kateri človek v svoj življenjski prostor vnaša snovi, ki pomenijo tveganje za človekovo zdravje, ogrožajo naravne biološke vire in predstavljajo nevarnost ekosistemu (Plut, 2004).

V naravi se večina odpadnih snovi razgradi, morebitni ostanki pa so relativno neškodljivi. Človek pa s svojim poseganjem v naravne krogotoke v naravno okolje množično vnaša vrste materialov in snovi, ki se zelo počasi in le delno ali sploh ne razgradijo in rušijo naravno ravnovesje in samočistilne sposobnosti okolja (Šebenik, 1994).

Za odlagališče odpadkov Uredba o odlaganju odpadkov, 2006 šteje že :

»napravo ali več naprav za odlaganje odpadkov na površini tal ali pod njo. Za odlagališče šteje tudi naprava ali del naprave, kjer povzročitelj odpadkov skladišči svoje odpadke na kraju njihovega nastanka več kakor tri leta pred oddajo v nadaljnjo predelavo po postopkih predelave v skladu s predpisom, ki ureja ravnanje z odpadki ter stalna naprava ali del naprave, kjer se odpadki skladiščijo več kakor eno leto pred oddajo v nadaljnjo ravnanje po postopkih odstranjevanja v skladu s predpisom, ki ureja ravnanje z odpadki«

Divje odlagališče odpadkov je odlagališče, na katerega se odpadki odlagajo nenadzorovano, nelegalno, na površine, ki temu niso namenjene (Šebenik, 1994). Veliko divjih oz. črnih odlagališč se v Sloveniji nahaja na območjih, kjer tečejo glavne žile podtalne vode, ki so glavni vir pitne vode. Negativnih posledic pa divja odlagališča nimajo samo na pitno vodo, temveč tudi na rastlinski in živalski svet okolja, kjer se nahajajo ter tudi na ekonomski in socialni aspekt življenja človeka (kvari izgled okolja, onemogoča razvoj turizma ipd) (Šebenik, 1994).

1. 1. 1 Negativni vplivi divjih odlagališč

Posledice kopičenja odpadkov na nenadzorovanih odlagališčih se kažejo v različni stopnji onesnaženosti posameznih pokrajinskih elementov, kot so relief, prst, voda, vegetacija in živalski svet (Plut 1998).

Onesnaženje vode

Izredno problematična je predvsem onesnaženost podtalnih voda, saj je le ta glavni vir pitne vode. Do onesnaženja pride preko t.i izcednih voda, ki so onesnažene z različnimi odpadki in snovmi (Šebenik 1994). Izcedna voda je v »telesu odlagališča odpadkov nastajajoča voda, katere vzrok so navadno padavinske vode in, ki se na odlagališču onesnaži zaradi izluževanja, kontaminacije z vodo, ki se izceja iz odpadkov z visoko vsebnostjo vode ter iz vode ali ki nastane zaradi razkrojevanja odpadkov« (Uredba o emisiji snovi, ki vsebujejo azbest 2000).

Medtem, ko se organsko onesnaženje čisti, je kemično onesnaženje praktično trajno. Skupaj z vodo pa se onesnažuje tudi prst, ki onesnaženje zadržuje (Kisovec 2007, 52, Kokanović 2013).

Onesnaženje prsti in vpliv na vegetacijo

Odlaganje kemikalij je najpogostejši vzrok onesnaženja prsti. "Gre za gnojila, pesticide, ki se razgrajujejo zelo počasi, živalske in človeške odplake itd. Najbolj škodljive so kovine oz elementi: živo srebro, svinec, kadmij, nikelj in baker. Težke kovine v prsti zmanjšujejo rodovitnost zemlje in posledično tudi produktivnost kmetijstva. Kovine (cink, baker, kadmij, nikelj) lahko ostanejo v prsti tudi nekaj tisoč let.« (Bohinc 2006).

Ko rastline črpajo iz onesnažene prsti različne snovi, lahko pride do zaostajanja v rasti, razgradnje listov in tanjšanja rastline (Bohinc 2006).

Vpliv onesnaženja na živalstvo

Odlagališča z biološkimi komunalnimi odpadki nudijo hrano in zatočišče različnim vrstam živali ter tako predstavljajo ugodno življenjsko okolje (npr. za glodavce in muhe). V zavrženih predmetih iz gospodinjstev ter gradbenem materialu se zadržuje deževnica, v kateri se lahko razvijejo komarji. Znano je, da se nekatere vrste komarjev razmnožujejo prav v majhnih vodnih telesih, ki se razvijejo na primer v odvrženih pnevmatikah. (Bužan in sod. 2013).

1. 1. 2 Problematika divjih odlagališč

Redek ali nereden odvoz komunalnih odpadkov je bil v preteklosti poglavitni vzrok nepravilnega odlaganja odpadkov. Prav tako so redko odstranjevali gradbeni material in kosovne odpadke, preventivna in ozaveščevalna dejavnost pa praktično ni obstajala. Kljub temu, da je danes odstranjevanje komunalnih in kosovnih odpadkov dobro organizirano, plačljivost storitev odvoza in deponiranja (za gradbeni material npr. je potrebno dodatno doplačati) višata odstotek nelegalnega odlaganja odpadkov in divja odlagališča so še vedno pogost pojav. Kisovec (2007) navaja, da so »Divja odlagališča odpadkov posledica nekulture, nepoštenosti in nepoučenosti ljudi«.

1.1.3 Zakonodaja

V Republiki Sloveniji je problematika ravnanja z odpadki razdeljena na zakonodajni del (zakoni in predpisi), ki ga predstavlja država ter izvedbeni del (izvajanje dejavnosti po zakonih in predpisih države), za katerega so zadolžene občine in komunala.

Osnovni predpisi, ki urejajo področje ravnanja z odpadki v Sloveniji so *Zakon o varstvu okolja* (Uradni list RS, št. 39/06 in spremembe), *Uredba o ravnanju z odpadki* (Uradni list RS, št. 34/08) ter *Resolucija o nacionalnem programu varstva okolja*. Obstajajo tudi specifični predpisi za vse vrste odpadkov in predpisi, ki določajo, kako predelati oz. odstraniti odpadke.

Zakon o varstvu okolja (ZVO-1) je bil sprejet leta 2004. Zakon ureja varstvo okolja pred obremenjevanjem kot temeljni pogoj za trajnostni razvoj in v tem okvirju določa temeljna načela varstva okolja, ukrepe varstva okolja, monitoring in informacije o okolju,

ekonomske instrumente varstva okolja, javne službe varstva okolja in druga z varstvom okolja povezana vprašanja. (Uradni list RS, št. 41/2004).

Resolucija o nacionalnem programu varstva okolja je osnovni strateški dokument na področju varstva okolja, katerega cilj je splošno izboljšanje okolja in kakovosti življenja ter varstvo naravnih virov (Uradni list RS št.2/06). Ta resolucija vsebuje tudi programe za ravnanje z odpadki (npr. zbiranje komunalnih odpadkov, program ravnanja z nevarnimi odpadki...).

1.1.4 Civilne iniciative

Ena najvidnejših civilnih pobud so bile akcije Očistimo Slovenijo v enem dnevu (Tepina in sod 2013). Društvo Ekologi brez meja je leta 2011, po estonskem modelu, prvič izpeljalo akcijo Očistimo Slovenijo v enem dnevu. Cilj vseslovenske akcije je bilo očistiti čim večje število divjih odlagališč. V ta namen so odprli t.i register divjih odlagališč, kamor so lahko posamezniki sporočali lokacije in obseg divjih odlagališč. Lokalne enote so nato s pomočjo prostovoljcev organizirale čiščenje in odvoz odpadkov iz teh odlagališč.

Akcija je bila uspešno ponovljena tudi leta 2012. V letu 2013 pa so se zaradi visokih logističnih in finančnih zalogajev odločili, da ne ponovijo vseslovenske akcije, temveč to prepustijo lokalnim skupnostim in lokalnim iniciativam ob njihovi podpori (uporaba logotipa, svetovalna pomoč itd).

Še danes je odprt register divjih odlagališč, prav tako pa so pripravili tudi spletno stran »Kam s tem odpadkom?«, katere namen je osveščati in pomagati pri učinkovitejšem ločevanju odpadkov in skrbi za okolje.

Njihovo novo geslo je »Očistimo Slovenijo- Za vedno!«

1.2 Virus limfocitnega horiomeningitisa

Virus limfocitnega horiomeningitisa (LCMV) sodi v družino Arenaviridae, ki jo sestavlja 22 vrst virusov. Delimo na viruse Starega in Novega sveta. LCMV uvrščamo med arenaviruse Starega sveta (Salvato in sod., 2005). Razširjen je po vsem svetu, močno prisoten pa je predvsem v Evropi, Ameriki, Avstraliji in na Japonskem. Naravni gostitelj virusa je hišna miš (*Mus musculus*), ki prenaša virus horizontalno in vertikalno znotraj geografskega območja ter s tem zagotavlja ohranjanje virusa v naravi. V okolico se izloča preko slin, urina, mleka ali fecesa. Poleg naravnega gostitelja lahko LCMV okuži tudi naključne gostitelje iz družine miši (*Muridae*), polhov (*Gliridae*), voluharic (*Arvicolidae*) ali rovk (*Soricidae*) (Kraus in sod., 2003), prenaša pa se tudi na človeka, ki se lahko okuži neposredno (z ugrizom okužene živali) ali posredno (s stikom areosola urina ali fecesa). Okužba se pri ljudeh kaže predvsem z gripi podobnimi simptomi. Virus je občutljiv na običajna dezinfekcijska sredstva, toploto in izsuševanje (Kraus in sod., 2003).

1.2.1 Zgodovina

Leta 1933 je mesto St. Louis v Združenih državah Amerike prizadel val epidemije encefalitisa. Gre za prvo dokumentirano epidemijo te vrste. Med epidemijo so iz likvorja

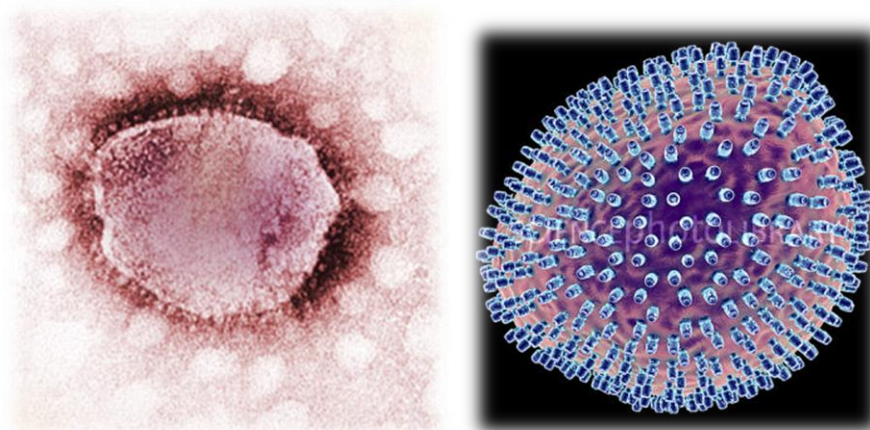
pacientke izolirali nov virus, ki je pri miših in opicah povzročal aseptični meningitis ter vročino. Poimenovali so ga virus limfocitnega horiomeningitisa (Dalton in sod., 1968).

Ugotovili so, da je ovojnica virusa peščenega videza in je tako podobna ovojnici virusov v skupini Tacaribe. S serološkimi testi so dokazali sorodnost obeh vrst kar je pripeljalo do preimenovanja. Prav po peščinem videzu ovojnic so jih poimenovali arenavirusi (Dalton in sod., 1968).

LCMV je tudi prvi arenavirus, ki so ga uspeli osamiti in kultivirati, zato je referenčna vrsta te družine (Dalton in sod., 1968).

1.2.2 Zgradba

LCMV je značilne nepravilne oblike, meri pa med 50 in 300 nm. Obdan je z lipidno ovojnico, v katero so vključene mrežasto razporejene beljakovine. V nukleokapsidi se nahaja enovijačna segmentirana ribonukleinska kislina (RNA) (Slika 1). RNA molekula je bipolarna, kjer je del molekule RNA pozitivno polaren, drugi del molekule pa negativno polaren. Pozitivni del genoma se neposredno prevede v beljakovine, negativni del pa najprej virusna transkriptaza prepíše v komplementarno mRNA (Avšič – Županc, 2002).



Slika 1: Slika in grafični prikaz strukture LCMV. Jasno vidna nepravilna zrnata kroglasta površina kapside

(Vir: www.microbiologybytes.com)

Genom sestavljata dva segmenta; velik segment oz L in majhen segment oz S. Segment L je velik približno 7200 bp, in nosi zapisa za beljakovino L (od RNA odvisna RNA polimeraza) in manjšo strukturo, beljakovino Z. Segment S je manjši dolg približno 3500 bp in nosi zapis za strukturni beljakovini NP in GPC (Southern in sod. 1996).

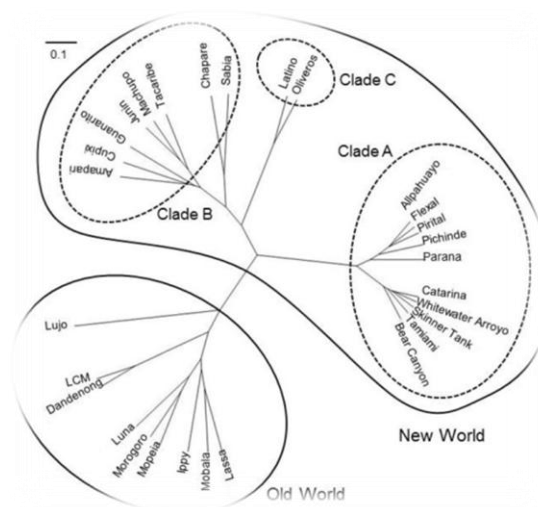
Beljakovine so kodirane v neprekrivajočih se bralnih okvirjih. Ločuje jih medgenska nekodirajoča regija, ki tvori zanko. 5' in 3' konec vsakega segmenta sta nekodirajoča. Na vsakem koncu se nahaja 19 terminalnih nukleotidov, ki so reverzno komplementarni nasprotnemu koncu. Beljakovine NP, G1 in G2 so pomembni antigeni, na katerih je

zasnovana filogentska razdelitev. Izmed vseh je beljakovina NP (na segmentu S) najbolj ohranjena (Southern in sod, 1996).

1.2.3 Filogenija

V družino *Arenaviridae* uvrščamo 1 rod *Arenavirus*, v katerem je 22 vrst (ICTV). V večini primerov so naravni gostitelji glodavci iz družine miši Muridae (ki je povezana z virusi Starega sveta) ali Sigmondontinae (katere vrste so vezane na viruse Novega sveta). Na koevolucijo oz. dolgotrajno povezanost arenavirusov in njihovih gostiteljev nakazuje filogenetski razvoj, ki se skoraj popolnoma ujema med virusom in gostiteljem (Salvato in sod., 2005).

Leta 2007 so Gonzalez in sodelavci predstavili hipotezo o koevolucijskem razvoju arenavirusov in njihovih naravnih gostiteljev. Predpostavljajo, da je prednik arenavirusov kronično okužil prednika glodavcev, preden se je le-ta razvil v dve ločeni družini, potem pa se je vsaka veja neodvisno razvijala s svojimi vrstami arenavirusov. Raziskovalci sklepajo, da ravno iz tega izhaja specifična vez med vrsto glodavca in pripadajočo vrsto arenavirusa. Dodatno podporo tej hipotezi najdemo, če primerjamo filogenetski drevesi glodavcev in arenavirusov. Glavna delitev glodavcev na družini Muridae in Sigmondontinae se ujema z razdelitvijo arenavirusov med viruse Starega in Novega sveta.



Slika 2: Filogenetsko nekoreninjeno drevo družine Arenaviridae (vir: Urata in sod, 2012)

Arenavirusi so razvrščeni v 4 filogenetske linije. Ena linija predstavlja arenaviruse Starega sveta. V to skupino poleg LCMV uvrščamo še virus Lassa, Mopeia, Mobala in Ippy. Vse arenaviruse Starega sveta najdemo v Afriki, le LCMV je izjema, saj je zaradi geografske pokritosti svojega naravnega gostitelja prisoten na vseh celinah (Peters in sod., 1996).

Ostale tri filogenetske linije sestavljajo skupino arenavirusov Novega sveta in so poimenovane A, B in C, med katerimi najdemo viruse kot so: Whitewater Arroyo,

Tamiami, Parana, Sabia), Machupo, Amapari, Tacaribe, Oliveros, Latino in drugi. Vse arenaviruse Novega sveta najdemo v Latinski Ameriki, nekaj pa tudi v ZDA. (Emonet in sod., 2006).

Filogenetska klasifikacija temelji na analizi genov za beljakovine NP, GPC, Z in L. Analize vseh štirih genov potrjujejo monofiletski izvor arenavirusov Starega sveta in potrjujejo serološko razvrstitev (Emonet in sod., 2006).

1.2.4 Gostiteljske vrste

Naravni gostitelj LCMV je hišna miš. Pri tej LCMV povzroča trajno okužbo. Poleg naravnega gostitelja lahko LCMV okuži tudi druge manjše sesalce, ki si s hišno mišjo delijo življenjski prostor. Med temi t.i naključnimi gostitelji najpogosteje najdemo okužene primerke iz drugih rodov miši, polhov, voluharic ter iz družine rovk. Za naključne gostitelje velja, da je okužba prehodne narave (Salvato in sod., 2005).

Hišna miš (*Mus musculus*)

Hišno miš najdemo po celotni Evrazijski celini, severni Afriki, Avstraliji in na obeh Ameriških celinah. Prisotna je tudi na celotni površini slovenskega ozemlja, vendar je gostota njene populacije močno odvisna od prisotnosti človeka, saj se navadno naseli v človeških domovih, shrambah, hlevih in drugih gospodarskih poslopih. V višjih legah je prisotna le izjemoma. V Sloveniji sta prisotni podvrsti *Mus (musculus) musculus* in *Mus musculus domesticus*. (Kryštufek 1991).

Hišno miš klasificiramo v rod hišnih miši, družino miši ter red glodavcev. Hišna miš ima sivo rjav hrbet in siv trebuh z rjavimi toni. Aktivne so predvsem ponoči, so zelo urne, dobro plezajo in plavajo. Živijo v majhnih skupnostih, ki so sestavljene iz dominantnega samca in ene ali več samic. Prehranjujejo se tako z rastlinsko kot z živalsko hrano. Samice so breje od 20 do 21 dni in skotijo od 4 do 8 golih in slepih mladičev. Kotijo preko celega leta, spolno zrelost dosežejo z 2 – 3 meseci. Življenjska doba v naravi je 18 mesecev, v ujetništvu lahko živijo do 4 leta. V naravi jih lovijo male in srednje zveri, sove in ujede; v urbanem okolju pa domače mačke (Kryštufek, 1991).



Slika 3: Glavni gostitelj LCMV-hišna miš (vir: Josef Hlasek: www.hlasek.com)

Rumenogrla miš (*Apodemus flavicollis*)

Geografsko je razširjena po celotni Evropi. Od severozahoda Pirenejskega polotoka do Urala na vzhodu. Na severu sega do južne Skandinavije, na jugu pa do Apeninskega in Balkanskega polotoka. Pri nas je razširjena po celi državi, z izjemo priobalnega pasu. Poseljuje gozdnata območja do višine 1500 m (Kryštufek, 1991).

Rumenogrla miš spada v rod belonogih miši (družina: Muridae). Ima velike oči, dolge uhlje in rep, ki je daljši od telesa. Trebuh je bele barve in ostro omejen od rjavega hrbta. Značilen je sklenjen rumen trak preko grla, po čemer je tudi dobila ime (Kryštufek, 1991).



Slika 4: Rumenogrla miš, ena naključnih prenašalskih vrst (vir: Lubomir Hlasek, www.hlasek.com)

Navadna belonoga miš (*Apodemus sylvaticus*)

Navadna belonoga miš je splošno razširjena po celotni Evropi do južne Skandinavije in Islandije na severu. Živi še v severni Afriki, Mali Aziji, na Kavkazu, zahodni Sibiriji, Himalaji, Nepal, Pakistanu, Afganistanu in Iranu. V Sloveniji je splošno razširjena najdemo jo nadmorske višine 1000m (Kryštufek, 1991).

Zelo je podobna rumenogrlji miši. Vrsti s ločita po tem da je rep je navadno krajši od telesa. Prav tako ima krajše uhlje in stopalo. Hrbtni del kožuha je rjavkast, v katerem lahko prevladujejo sivkasti ali rdečkasti toni in ima sivo bel trebupni del (včasih z rjavkastimi ali rumenkastimi odtenki), ki nista ostro razmejena, ampak prehajata eden v drugega. Na grlu ni nikoli sklenjene rumene ovratnice. (Kryštufek, 1991)

Prednost daje odprtim habitatom, čeprav jo izjemoma najdemo tudi v gozdovih. Pogosta je na obdelovalnih površinah. V submediteranskem območju je pogostejša od rumenogrlje miši (Kryštufek, 1991).



Slika 5: Rumenogrla miš (*Apodemus sylvaticus*) (Vir: Lubomir Hlasek; www.hlasek.com)

Dimasta miš (*Apodemus agrarius*)

Dimasta miš je v Sloveniji razširjena vzdolž Mure (do Turjancev pri Radencih), Drave (poznana iz Ormoža), Save (do Zidanega mosta) in Krke (do Šentjerneja). Izolirana populacija živi v submediteranskem nižavju zahodno od črte Gorica - Podnanos - Ilirska Bistrica. (Kryštufek, 1991).

Hrbtni del kožuha je izrazito rdeče rjav po katerem se vleče 2 mm široka črna črta. Trebuh je siv in ostro omejen od barve hrbta. Dlaka je bolj ščetinasta kot pri ostalih dveh vrstah belonogih miši. Oči so manjše, uhlji, stopalo in rep pa krajši. Rep je povsem črn, uhlji in stopalo pa temni (Kryštufek, 1991).

Najdemo jo predvsem na gozdnem robu, obraščenih bregovih vodnih tokov, trstiščih, v živih mejah in poljih. Zaide tudi v človekova bivališča. Gre za pretežno nižinsko vrsto, vendar gre v gorah izjemoma do višine 1200 m (Kryštufek, 1991).



Slika 6: Dimasta miš (*Apodemus agrarius*) (Vir: Lubomir Hlasek; www.hlasek.com)

1. 2. 5 Detekcija virusa v Sloveniji in na Hrvaškem

Gozdni delavci, lovci, kmetje ter ne nazadnje tudi ljubitelji malih živali, kot so hišne miši in hrčki, sodijo v izpostavljeno skupino ljudi za okužbe z LCMV (Kraus in sod., 2003). Leta 2002 so izvedli pilotsko raziskavo o prekuženosti gozdnih delavcev z virusom LCMV v Sloveniji. V laboratoriju za diagnostiko zoonoz na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo so zbrali in testirali serume gozdnih delavcev iz različnih lokacij Slovenije. Serume so testirali z metodo posredne imunofluorescence in potrdili prisotnost protiteles IgG proti arenavirusu LCMV (Bizimovska, 2008).

Pilotsko raziskavo prisotnosti LCMV pri malih sesalcih na območju Slovenije je leta 2008 opravila študentka mikrobiologije Tanja Bizimovska v svojem diplomskem delu. V raziskavi je uporabila 310 vzorcev iz 6 različnih območij v Sloveniji (Ig, Rakovnik, Cerknica, Tenetiše, Vransko in Pohorje). Izmed 296 serološko pregledanih vzorcev je bilo 17 serum pozitivnih (5,7%) kar je primerljivo tudi z drugimi podobnimi študijami po Evropi (Ledesema s sod, 2009; Kallio-Kokko in sod., 2010, Lledó in sod., 2003, Yama in sod., 2012), kjer seroprevalenca znaša med 3 in 17% . Od 6 pregledanih vzorcev hišne miši je bil 1 vzorec LCMV pozitiven.

Z metodo posredne imunofluorescence so pregledali 10 vzorcev glavnega gostitelja in 290 vzorcev naključnih gostiteljev. Okuženost naključnih gostiteljev je bila 5.5 %. Pregledali so 197 vzorcev rumenogrle miši (9 pozitivnih; 4.6 %), 88 vzorcev gozdne voluharice (6 pozitivnih; 6.8 %), 4 vzorce gozdne rovke (1 pozitivna) in 1 vzorec navadnega polha, ki je bil negativen. Prisotnosti virusne RNK pa niso uspeli potrditi z metodo RT-PCR v realnem času.

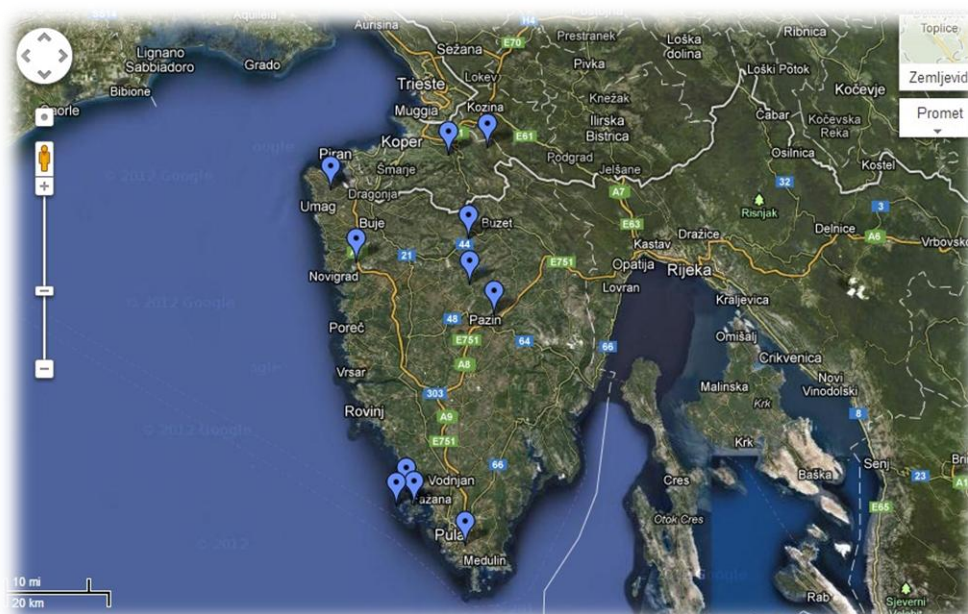
Na hrvaškem je bila analiza opravljena 2006 na otoku Vir, kjer poročajo o najvišji okuženosti z LCMV med prebivalci v svetovnem merilu (36%). Raziskava navaja, da je bilo seropozitivnih kar 155 od 425 testiranih oseb, kar nakazuje na hitro širjenje virusa med prenašalci. Razlog lahko iščemo tudi v geografski izoliranosti otoka, kjer je interakcija med okuženimi prenašalci in zdravo populacijo dosti večja. Bistvenih razlik med okuženostjo ter spolno/starostno skupino testiranih oseb ni bilo (Dobec in sod. 2006).

2 METODE DELA

Delo je potekalo po dveh ključnih fazah. Terensko delo je obsegalo vzorčenje in pripravo tkiv, katere smo nato uporabili pri laboratorijski analizi.

2.1 Terensko delo

Vzorčenje je potekalo na različnih lokacijah tako v slovenski kot hrvaški Istri. Največ vzorcev smo pridobili na divjih odlagališčih v Podgorju (Slovenija) in na divjih odlagališčih pri mestih Umag in Pula (Hrvaška). Vzorčenje je potekalo še na drugih lokacijah in sicer na otočju Brioni, ob reki Mirni, pri Pazinu in Kaščergi ter Istrskih Toplicah na Hrvaškem ter na Rakitovcu in Sv. Antonu v Sloveniji.



Slika 7: Zemljevid vzorčnih lokalitet. Z izbranimi področji smo zajeli celoten istrski polotok

Vzorčna mesta smo definirali kot štiri različne habitate: popolnoma naraven gozdni habitat (Istrske Toplice, Hrastovlje); polnaraven habitat, ki združuje njive, travnike, izlive rek, ter manjša razpršena odlagališča, kjer je antropogeni vpliv manjši (Kaščerga, Podgorje, Sv. Anton, Rakitovec, Pazin, Istrske Toplice 1 in 3, Mirna, Raša in Brioni 1 in 3); antropogen habitat (združuje kmetijo v Hrastovljah in vzorčna mesta na Malem Brion; ter večja odlagališča (Umag in Pula). Vzorčno lokacijo v Podgorju smo zaradi bioloških karakteristik definirali kot polnaravni habitat oziroma habitat z manjšim človeškim vplivom (povzeto po Bužan in sod. 2013).

Vzorčenje

Vzorke smo lovili z živolovnimi pasti tipa Sherman in Uggland. Ujete živali smo ustrezno transportirali v laboratorij, kjer smo jih humano usmrtili v CO₂ komori. Vsak organizem smo ustrezno označili, jim odvzeli vzorec krvi ter ločili notranje organe (srce, pljuča, vranica, ledvice in sečni mehur). Odvzete organe smo shranili pri -80° C. Iz vzorca krvi smo pripravili serum in ga hranili do nadaljnje analize pri -80° C.



Slika8:Primervzorčnega mesta Umag (vir: Bužan in sod., 2013)



Slika 9:Primer vzorčnega mesta Podgorje (vir: Bužan in sod., 2013)

2.2 Laboratorijsko delo

Laboratorijsko delo je vsebovalo 4 zaporedne postopke. Začetna faza je bila izolacija celokupnih nukleinskih kislin (DNK in RNK). Pridobljene izolate smo uporabili za določevanje vrste z analizo gena za citokrom b in za dokazovanje prisotnosti virusa z uporabo metode RT-PCR. Od vsakega vzorca smo vzeli tudi vzorec krvi za serumsko analizo prisotnosti virusa z uporabo metode posredne imunofluorescence (IFA).

2.2.1 Izolacija DNK in RNK

Da bi zagotovili čim manjšo možnost kontaminacije smo izolacijo opravljali v mikrobiološki komori, katero smo prehodno očistili z DNK/RNA Zap raztopinami in po vsakem delu pustili osvetljeno z UV lučjo. Prav tako smo pri pripravi tkiva za izolacijo uporabljali sterilne in očiščene skalpele, secirne igle, pincete in mikrocentrifugirke. Da bi zmanjšali možnost kontaminacije z lastno DNK smo redno zamenjevali rokavice in razkuževali delovne površine z alkoholom ter uporabljali predpisano zaščitno opremo.

Vzorci DNK in RNK smo izolirali iz tkiva vranice po navodilih proizvajalca. Uporabili smo komplet reagentov: Invitek-Stratec RTP DNA/RNA Virus Mini Kit (Katal. št: 1040100300). Postopek smo pričeli z odmerjanjem zadostne količine tkiva (približno 1 mm² tkiva), katerega smo prenesli v priloženo ekstrakcijsko mikrocentrifugirko (Extraction tube), ki je že vsebovala encime potrebne za lizo tkiva v liofilizirani obliki. Vzorcem smo dodali 400 µL ddH₂O ter nato inkubirali v vodni kopeli s konstantnim stresanjem 15 minut pri 65°C in nato še 10 min pri 95°C. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 1 minuto pri maksimalnih obratih (14 000 rpm). Nastali supernatant smo prenesli v novo reakcijsko posodico, preostalo usedlino in morebitno nelizirano tkivo smo zavrgli. Supernatantu smo dodali 400 µL raztopine *Binding solution*, ki omogoči učinkovitejšo vezavo nukleinskih kislin na filter kolone ter premešali na stresalniku. Vzorce smo prenesli na RTA Filter Set (v nadaljevanju kolona) in centrifugirali 1 minuto pri 10 000 obr/min. Filtrat smo zavrgli, kolono pa prenesli v novo kolekcijsko mikrocentrifugirko. Temu je sledilo prvo čiščenje vezane DNK/RNK z dodajanjem 500 µL R1 čistilnega pufra (*Wash buffer R1*) in 30 sekundnim centrifugiranjem pri 10 000 obr/min. Filtrat smo ponovno zavrgli ter prenesli v novo kolekcijsko mikrocentrifugirko. V naslednjem koraku smo dodali 700 µL R2 čistilnega pufra (*Wash buffer R2*) ter znova 30 sekund centrifugirali pri 10 000 obr/min. Kolono smo še enkrat prenesli v čisto mikrocentrifugirko ter centrifugirali 4 minute pri maksimalnih obratih, da smo odstranili še morebitno preostalo tekočino (predvsem etanol) iz prejšnjih korakov, s tem pa povečali čistočo izoliranega produkta. Po končanem centrifugiranju smo DNK/RNK eluirali s predhodno segretim (na 80° C) elucijskim pufrom (*Elution Buffer*). Po končani izolaciji smo vzorcem izmerili koncentracijo s spektrofotometrom Epoch. Za optimalno določitev smo porabili 3 µL izolata. Izolate smo shranili pri -80 °C.

2.2.2 Določevanje vrste z analizo gena za citokrom B

Včasih je natančna določitev vrste na terenu nemogoča. Temu lahko botruje juvenilnost organizma, neizkušenost taksonoma, morfološke variacije, podobnost med vrstami itd. Zato smo se odločil, da vrsto (posebej pa juvenilne osebkke) določimo z molekularnimi metodami. Za določitev vrste smo uporabili mitohondrijski gen za citokrom b. Podrobnosti metodologije so opisani v diplomskem delu Domna Trkova (2012) in Bužan et al. (2013).

2.2.3 Dokazovanje prisotnosti LCMV z metodo vgnezdjeni PCR

RNA molekule ne moremo pomnoževati z navadno verižno reakcijo s polimerazo, ker encim polimeraza DNA ne more uporabiti RNA molekule za matrico. RNA lahko pomnožujemo z RT-PCR, ki se od navadnega PCR-ja razlikuje le po tem, da najprej prepiše RNA v cDNA z encimom reverzne transkriptaze (RT, angl. Reverse transkriptaze). Vsi nadaljnji koraki med obema metodama so identični (Bustin, 2000).

Reverzna transkriptaza (RT) uporablja RNA vijačnico kot matrico, na kateri sintetizira cDNA. Nastane dvovijačni hibrid RNA/DNA. Encim RT ima še aktivnost RNase H, ki razgradi RNA v RNA/DNA hibridu. Na enoverižni matrici cDNA se nato sintetizira komplementarna veriga, tako da dobimo dvovijačno DNA, ki se nato pomnožuje v PCR ciklih (Lewin, 2004).

Vgnezdjeni PCR pomeni, da smo želeni fragment pridobili v dveh zaporedni reakcijah. Najprej smo iz celokupne DNA/RNA pomnožili daljši fragment (okoli 600bp), in nato PCR produkt uporabili za novo reakcijo, v katerem smo pomnožili manjši fragment.

V prvem PCR smo uporabili začetne oligonukleotide:

1817LCM-F (5`AIATGATGCAGTCCATGAGTGCACA`3) in

2247LCMV-R(5`TCAGGTGAAGGRTGGCCATACAT)

Povzeto po: Bowen in sod 1996, Bowen s sod 1997 in Emonet in sod 2007)

Zaradi večje racionalizacije uporabe reagentov smo vzorce združevali v skupine po 3. V kolikor je bil rezultat PCR iz skupine vzorcev pozitiven, smo vse tri vzorce iz skupine uporabili kot posamezne in ponovili PCR.

Priprava reakcijske mešanice za RT-PCR:

Reagenti:

Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Cat.No. Q210212, Qiagen)

Začetni oligonukleotidi (TibMolBiol)

Oprema:

Eppendorf MasterCycler-nexus gradient

Reakcijsko mešanico smo pripravili po naslednjem protokolu:

Tabela 1: Priprava PCR reakcijske mešanice za 1st round PCR

RNase-free H ₂ O	11 µl
5x Qiagen OneStep RT-PCR buffer	5,0 µl
10 mM dNTP Mix	1,0 µl
10 µM 1817LCM F	1,0 µl
10 µM 2477LCM R	1,0 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1,0 µl
RNA	5,0 µl

Optimiziran temperaturni profil:

50°C - 30 min

95°C - 15 min

95°C - 10 s

56°C - 30 s 45 x

68°C - 20 s

Dobljen PCR produkt smo preverili z glesko elektroforezo. Agarozno gelsko elektroforezo uporabljamo za ločevanje različno velikih fragmentov DNA. Ločevanje molekul temelji na potovanju molekul z električnim nabojem skozi agarozni gel v enosmernem električnem polju. Fragmenti DNA z negativnim nabojem potujejo znotraj gela od negativnega proti pozitivnemu polu s hitrostjo, ki je obratno sorazmerna logaritmu njihove molekulske mase (Andrews, 1986). Zaradi tega manjši fragmenti potujejo hitreje. Kakovost ločevanja fragmentov je odvisna predvsem od moči električnega polja, gostote gela in časa ločevanja. Za ločitev večjih fragmentov (nad 1.000 bp) so primerni geli z nizko gostoto (približno 0,7%), medtem ko je za učinkovito ločevanja krajših fragmentov primeren 1,5-odstoten gel. S povečevanjem časa potovanja molekul se povečuje tudi razdalja med posameznimi različno velikimi fragmenti, posledično pa tudi ločljivost fragmentov. Posebej velja opozoriti, da pri prevelikih napetostih potujejo delci na sredini gela hitreje kot na robu proge, kar lahko moti vrednotenje rezultatov.

Pri gelski elektroforezi smo uporabljali 1,5-odstotne gele (primerni za ločevanje fragmentov, dolgih od 200 do 4.000 bp). V žepke na agaroznem gelu smo dodali mešanico 5 µl produkta PCR reakcije, ki smo jo predhodno premešali s 3 µl aplikacijskega pufra (loading dye). Aplikacijski pufer obarva vzorce, da postanejo vidni, s čimer lahko sledimo njihovem potovanju na gelu. V zadnji žepki (navadno robni) smo dodali standard HYPPER LADDER (raztopina DNA s različno dolgiimi fragmenti, ki se med seboj razlikujejo za 100 bp), ki omogoča določitev dolžine posameznih fragmentov. Po

elektroforezi smo gel obarvali z etidijevim bromidom zaradi vidnosti pod UV lučjo. Po končanem barvanju smo gele spirali, da smo odstranili nevezani etidijev bromid. Gelska elektroforeza je potekala 30 min pri napetosti 120V. Temu je sledilo 10-20 min barvanje z etidijevim bromidom in nato še 10-20 minutbo spiranje z vodo. Gele smo posneli s Mini Bis kamero v programu Gel Capture.

Dobljene pozitivne vzorce smo nato razdružili in PCR reakcijo ponovili, tokrat posamične vzorce. Vse novo nastale pozitivne PCR produkte pa smo uporabili v vgnezdni PCR reakciji po naslednjem protokolu:

Reagenti:

Qiagen Hot start Polymer (Cat.No. Q210212, Qiagen)

Začetni oligonukleotidi (TibMolBiol):

1902LCM F (5`CCAGCCATATTTGTCCCACACTTT`3)

2346LCM R (5`AGCAGCAGGYCCRCCTCAGGT`3) (Bowen in sod 1996, Bowen in sod 1997 in Emonet s sod 2007)

Oprema:

Eppendorf Mastercycler-nexus gradient

Reakcijsko mešanico smo pripravili po naslednjem protokolu:

Tabela 2: Priprava PCR reakcijske mešanice za 2nd round PCR

RNase-free H ₂ O	36,5 µl
10x Qiagen PCRbuffer	5,0 µl
10 mM dNTP Mix	1,0 µl
10 µM 1902LCM F	1,0 µl
10 µM 2346LCM R	1,0 µl
25mM Mg ⁺⁺	1,0 µl
Hot Start taq DNA poly	0,25 µl
1st round PCR produkt	2,0 µl

Optimiziran temperaturni profil:

95°C - 15 min

95°C - 20 s

58°C - 30 s

72°C - 40 s

72°C – 5min

45 x

PCR produkte smo zaznali z agarozno elektroforezo (glej zgoraj).

Dobljene pozitivne produkte smo očistili z direktnim čiščenjem PCR produktov.

2.2.3 Določanje nukleotidnega zaporedja

Pomnožena DNA še ne zagotavlja optimalnih rezultatov za pridobivanje sekvenc. Zato smo pred sekvenčno reakcijo PCR produkte očistili z metodo direktnega čiščenja. Za direktno čiščenje smo uporabili FastTM Thermosensitive Alkaline Phosphatase (AP) in Exonuclease I (Exo I).

V mikrocentrifugirki smo zmešali 5 ul PCR produkta, 0,1 ul ExoI, 0,5 enote (Unit) AP in 1,4 uL PCR pufra. Nato smo mešanico inkubirali 45 min pri 37°C, da so se razgradili začetni oligonukleotidi in nukleotidi, ter nadaljnjih 15 min pri 80° C, da smo inaktivirali encima.

Za sekvenčno reakcijo smo uporabili BigDye 3.1 (Applied Biosystems)

Za sekvenčno reakcijo smo v mikrocentrifugirki (stip ali plošča) zmešali:

- 3 ul očiščenega PCR produkta
- 0,2 ul začetnega oligonukleotida (2pmol; 0,2 uL 10Mm koncentracije)
- 0,5 uL Big Dye
- 2 uL BigDye pufra
- 4,3 uL H₂O

Končni volumen reakcije je bil 10 ul.

Začetni denaturaciji pri 96°C za 3 min je sledilo 50 ciklov, ki so bili sestavljeni iz denaturacije pri temperaturi 96°C za 10 sekund, prileganje začetnih oligonukleotidov pri 58°C za 10 sekund in podaljševanje verige pri 60°C za 4 minute. Zaključili smo s segrevanjem na 72°C za 7 min.

Po sekvenčni reakciji smo produkte očistili s postopkom precipitacije z etanolom in EDTA. Vzorec smo kratko centrifugirali. Dodali smo mu 2,5 uL 125 mM EDTA s pH 8.0, ter ponovno kratko centrifugirali, da je EDTA prišel v stik s sekvenčno reakcijo. Nato smo dodali 30 uL 96% etanola. Ploščo smo prekrili s folijo ter jo premešali tako, da smo jo nekajkrat obrnili. Ploščo smo nato inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 55 minut pri 4°C na maksimalni hitrosti (14 000 obratov/min). Supernatant (etanol) smo izlili, nakar smo centrifugirali ploščo obrnjeno navzdol pri 190xG za 2 minuti. Po centrifugiranju smo ploščo inkubirali 5 min na sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo. Dobljen produkt smo razopili v 12uL formamida. Tako pripravljenim vzorcem smo s sekvenatorjem AbiPrism 3130 (Applied Biosystems) določili nukleotidno zaporedje.

Dobljene sekvence smo obdelali s programom Codon Cod Aligner, ter urejene sekvence vnesli v program BLAST (NCBI).

2.2.4 Metoda posredne imunofluorescence

Za izvedbo metode posredne imunofluorescence smo potrebovali krvni serum, katerega smo pridobili iz odvzetega vzorca krvi s centrifugiranjem. S to metodo želimo dokazati prisotnost protiteles proti LCMV. Metoda posredne imunofluorescence je relativno hitro

izvedljiva in specifična. Protitelesne komplekse lahko opazujemo s fluorescentno mikroskopijo, saj se prisotna protitelesa v serumu vežemo na virusni antigen nanešen na objektno steklo. Nato na celoten kompleks vežemo še sekundarna protitelesa, ki so označena s flourokromi. Flourokromi so snovi, ki absorbirajo svetlobo določene valovne dolžine in oddajo svetlobo druge valovne dolžine (Avšič-Županc, 2005).

Metoda IFA za dokazovanje protiteles proti LCMV ni komercialno dostopna. Zato smo objektna stekla z nanesenim ustreznim virusnim antigenom (VERO celice z virusom mopeia) in pozitivno kontrolo (humani serum, redčen 1:10) dobili od Dr. Remi Charrel, virologa, ki se ukvarja tudi z LCMV na Université de la Méditerranée v Marseju v Franciji. Zaradi pričakovane nizke prevalence virusa, smo po 2 seruma združili in jih ob morebitni pozitivnosti še enkrat ločeno analizirali. Vse vzorce smo analizirali pri redčini 1:10. Prav tako smo v prvi seriji testirali ustreznost koncentracije uporabljenega konjugata in sicer v razmerjih 1:32 in 1:64. Za ustrežnejšo se je izkazala koncentracija konjugata v razmerju 1:32 katero smo tudi uporabili v vseh nadaljnjih pripravah preparatov.

Za vzorce miši smo uporabili konjugat Anti-Mouse IgG (whole molecule-FITC, P.N: F0257, LOT: SLBB4878). Anti-humani-IgG (Ready to use, EBV kit) je bil uporabljen kot konjugat za pozitivno kontrolo. Za negativno kontrolo smo uporabili fosfatni pufer (PBS).

Pred pričetkom priprave preparatov, smo objektna stekelca z nanesenim antigenom segreli na sobno temperaturo, saj smo le-te hranili pri temperaturi -20°C .

Predmetnik smo nato položili v vlažno komoro ter na vsako polje nanesli 20 uL zredčenega seruma (v razmerju 1:10). Vlažno komoro smo nato inkubirali 30 min pri 37°C .

Po končani inkubaciji smo predmetnik oplaknili s PBS pufrom in pri tem pazili, da curek ni direktno tekel čez opazovalna polja. Predmetnik smo nato spirali 3x po 5 minut v PBS pufru (pH 7,2), ter nazadnje še enkrat oplaknili z destilirano vodo. Tako pripravljen predmetnik smo nato posušili na zraku.

Na suh predmetnik smo nato nanesli 20 uL ustreznega konjugata predhodno zredčenega v razmerju 1:32. Predmetnik smo ponovno inkubirali 30 minut v vlažni komori pri 37°C . Po inkubaciji smo ponovili postopek spiranja. In sicer 3x po 5 minut v PBS pufru, ter zadnje spiranje z destilirano vodo.

V banjico s PBS pufrom smo nato dodali 2 kapljici Evansovega modrila, ter počakali da se barvilo enakomerno razporedi v tekočini. V banjico smo nato dodali še preparat in ga barvali približno 5 minut. Odvečno tekočino smo odlili ter sprali preparat z destilirano vodo. Na opazovana polja smo nanesli po kapljico reagenta Mounting Media, pokrili s krovnim stekelcem. Temu je sledilo mikroskopiranje s fluorescentnim mikroskopom pri 400x povečavi.

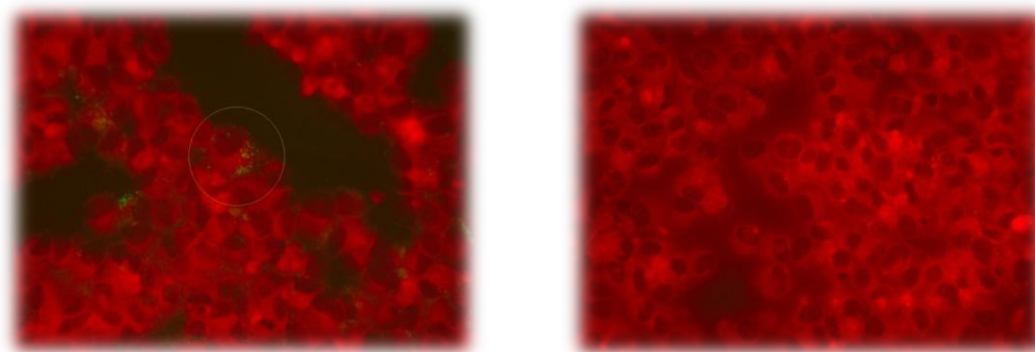
3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Človek z svojim vplivom nemalokrat posega v okolje in s tem v naravne habitate mnogih organizmov. V obdobju naraščanja človeške populacije je vedno bolj pereče vprašanje ravnanja z odpadki in njihov vpliv na okolje. Eden takšnih problemov predstavljajo divja odlagališča. Le ta predstavljajo svojevrsten habitat za razne živalske vrste, med drugimi tudi takšne, ki so lahko prenašalke različnih bolezni (zoonoz), kar pa lahko vpliva tudi na zdravje ljudi.

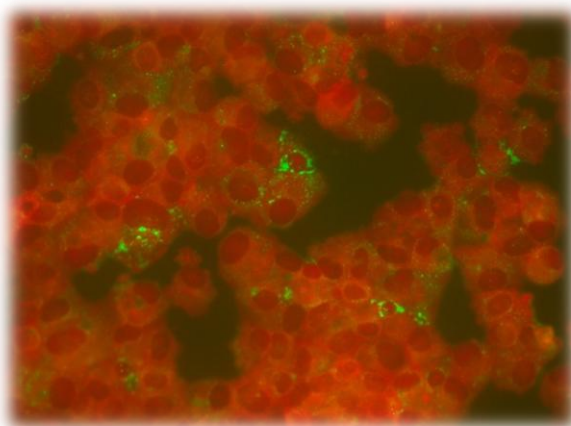
Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti prisotnost in razširjenost virusa limfocitnega horiomeningitisa na območju divjih slovenske in hrvaške Istre.

V diplomski nalogi smo analizirali skupno 83 vzorcev iz različnih vzorčnih mest. Za vsako državo smo določili 3 glavna vzorčna mesta (kje je bilo največje število vzorčnih organizmov). Vsi izbrani vzorci so bili analizirani z metodo posredne imunofluorescence. 46 vzorcev pa tudi z molekularno metodo.

Glede na to, da je ta metoda posredne imunofluorescence relativno subjektivna in odvisna od izkušenj laboranta sem s tem delom skušala postaviti parametre za določitev pozitivnosti vzorca za kasnejšo rutinsko analizo. Pregledane vzorce smo ločevali na pozitivne in negativne pri čemer smo za pozitiven rezultat šteli izključno tiste, ki so imeli fluorescentno obarvane zrnaste strukture v citoplazmi -obarvana protitelesa. Vzorci, ki teh parametrov niso dosegali oz. so bili visoko nespecifični so veljali za negativne (Slika 10).



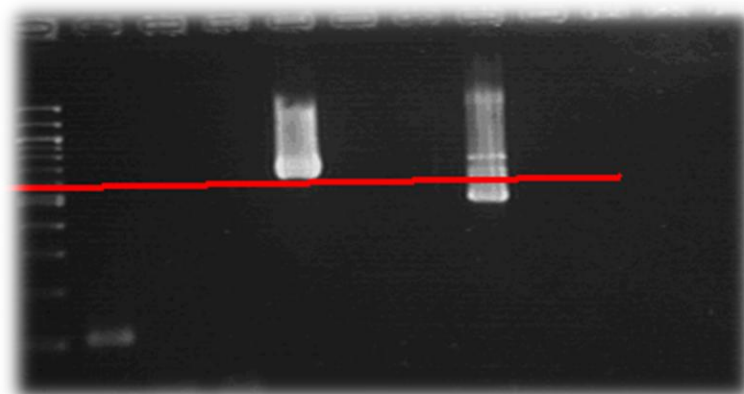
Slika 10: Negativna kontrola, brez obarvanih zrnastih citoplazmatskih struktur (zg. desno) in pozitivna kontrola, kjer so vidne zeleno obarvane zrnaste strukture v citoplazmi (zg. levo)



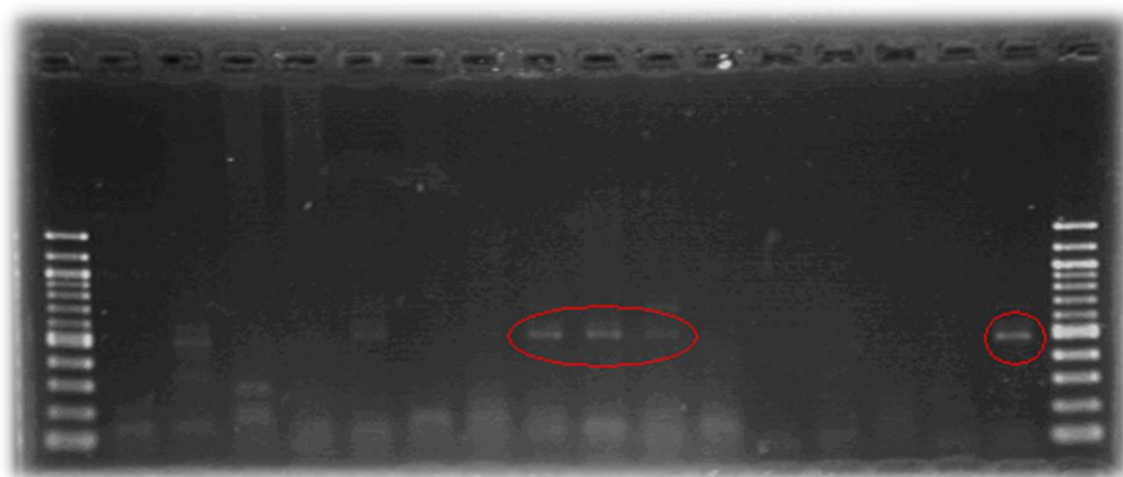
Slika 11: Določitev pozitivnega vzorca

V 20 vzorcih od skupno 83 testiranih po metodi IFA, smo dokazali prisotnost protiteles proti virusu LCM. Pozitiven serološki test nakazuje na že prebolelo obolenje z virusom LCMV, medtem ko prisotnost virusne RNK v 11 vzorcih nakazuje na akutno okužbo. Dobljeni elektroforegram je pokazal jasne fragmente ustreznih dolžin (600bp 1st round in 400bp 2nd round PCR) skupaj z dejstvom, da smo uporabili visoko specifične začetne oligonukleotide lahko predvidevamo, da gre za prisotnost RNK LCMV. Za pozitivne vzorce smo naredili tudi sekvenčno analizo, vendar bi bilo potrebno za nedvoumne rezultate virus še laboratorisjko vzgojiti in analizirati.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je virus limfocitnega horiomeningitisa prisoten na območju Istre in s tem smo prvo hipotezo potrdili.



Slika 12: Pozitiven PRC produkt: Fragment dolžine okoli 600 bp za 1st round PCR



Slika 13:RNA vzorci dolgi okoli 450 bp 2nd round nPCR

3.1 Okuženost glede na vrsto

Tabela 3: Okuženost glede na vrsto po metodi IFA

	VRSTA	ŠT. POZITIVNIH	ŠT.NEGATIVNIH	ŠT.ANALIZIRANIH	ODSTOTEK OKUŽENIH (%)
SLO	Mus sp.	2	3	5	40
	Apodemus sp.	5	16	21	23,81
	Ostalo	1	10	11	9,10
HR	Mus sp.	7	7	14	50
	Apodemus sp.	2	14	16	12,5
	Ostalo	0	2	2	0
SKUPAJ:	Mus sp.	9	10	19	47,37
	Apodemus sp.	7	30	37	18,92
	ostalo	1	12	13	7,69

Glede na to da je hišna miš naravni rezervoar LCMV smo želeli preveriti, ali se pri tej vrsti virus pogosteje pojavlja kot pri sorodnih vrstah dimaste (*Apodemus agrarius*) oz. gozdne miši (*Apodemus sylvaticus*). Zato smo izbrali 19 vzorcev hišne miši, in 50 vzorcev oportunistnih vrst (iz družine Apodemus). Testirali smo tudi eno vrsto rovke (*Crocidura leucodon*), ki je bila seronegativna. Po serološkem testiranju smo ugotovili, da je virus občutno bolj prisoten pri vrsti *Mus musculus* (47% serum pozitivnih vzorcev) kot pri preostalih dveh vrstah iz rodu *Apodemus* (16 % serum pozitivnih vzorcev). Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je hišna miš kot naravni gostitelj LCMV bolj podvržena k okužbi kot druge sorodne vrste. Posledično to za človeka lahko pomeni večjo izpostavljenost možnosti za okužbo, saj se areal hišne miši bolj pogosto prekriva z arealom človeka (po hišah, vrtovih itd.), medtem ko druge sorodne vrste bolj pogosto srečujemo v njihovem naravnem habitatu. Glede na to, da se divja odlagališča pogosto nahajajo v bližini urbanih naselij je smotrno predvidevati tudi večjo možnost okužbe pri ljudeh. Iz

naše ugotovitve, da je stopnja okuženosti na območjih kjer je interakcija med predstavniki ene populacije večja, lahko sklepamo, da bo v urbanih predelih blizu divjih odlagališč večja okuženost tudi tamkajšnjega prebivalstva. Hipotezo, da ne obstaja korelacija med vrsto glodavca in okuženostjo smo ovrgli.

3.2 Okuženost glede na okolje

Protitelesa za virus limfocitnega horiomeningitisa smo dokazali v 24,1 % vseh pregledanih vzorcev glodavcev, ujetih na divjih odlagališčih in na kontrolnih vzorčnih mestih (naravnem okolju) na Hrvaškem in v Sloveniji. Na Hrvaškem smo pregledali 30 glodavcev iz divjih odlagališč in pri njih ugotovili 39 % seroprevalenco virusa ter 15 glodavcev iz naravnega okolja, pri katerih je bil odstotek občutno nižji, to je 6,7%

Rezultati iz vzorčnih mest v Sloveniji so pokazali podoben trend. Ugotovili smo 33,3 % seroprevalenco virusa v 27 glodavcih iz divjih odlagališč ter 9,1 % seroprevalenco virusa v 11 glodavcih iz naravnega okolja. Hipotezo, ki pravi, da je stopnja okuženosti organizmov na divjem odlagališču večja kot v naravnem okolju, smo s tem potrdili. Vzroke za ta pojav lahko iščemo v okoljskih dejavnikih, saj je gostota populacije na tako majhnem arealu večja, kot bi bilo za te vrste pričakovati v naravnem okolju. Glede na to, da se virus prenaša aerosolno ali preko direktnega kontakta je verjetnost okužbe toliko večja na divjih odlagališčih, ki imajo manjši areal pri večji gostoti populacije.

Če pa primerjamo seroprevalenco naših vzorcev iz naravnega okolja z rezultati podobnih raziskav po Evropi pa lahko ugotovimo, da je seroprevalenca precej podobna. Namreč odstotek okuženosti v raziskavah iz Francije, Španije (Ledesema s sod, 2009) in Anglije kažejo na 3 do 17% seroprevalenco virusa v vrstah *Mus musculus* in *Apodemus sylvaticus* (Kallio-Kokko in sod., 2010, Lledó in sod., 2003, Yama in sod., 2012), pri nas pa je stopnja okuženosti organizmov v naravnem habitatu le 6,7%. Podoben trend nižje okuženosti organizmov iz naravnega okolja pa je pokazala tudi raziskava Bizimovske (2008), kjer navaja 5,7% seroprevalenco.

Iz dobljenih rezultatov smo tako dve hipotezi potrdili in eno ovrgli. Rezultati so jasno pokazali, da je LCMV prisoten na področju Istre, da je prisotnost okuženih organizmov z zoonozami na divjih odlagališčih večja kot pri organizmih vzorčenih v naravnem okolju ter da obstaja korelacija med vrsto gostitelja in stopnjo okuženosti. Glede na dobljene rezultate bi bile potrebne še nadaljnje raziskave prisotnosti drugih patogenov, ter sanacija divjih odlagališč, saj le ta lahko predstavljajo tudi potencialno nevarnost za zdravje ljudi.

4 ZAKLJUČEK

V diplomski nalogi smo obravnavali prisotnost zoonoz pri malih sesalcih, kateri so bili vzorčeni na divjih odlagališčih. Namen dela je bil preveriti ali so ti organizmi pogostejše prenašalci človeku nevarnih patogenov v primerjavi s tistimi, ki jih najdemo v njihovem naravnem okolju.

Ugotovili smo, da je virus limfocitnega horiomeningitisa bolj prisoten pri glodavcih, katerih habitat so predstavljala divja odlagališča. Okuženost smo zaznali tako pri glavnem gostitelju (hišna miš) kot tudi pri naključnih vrstah (gozdna in dimasta miš). Vendar je bila okuženost glavnega gostitelja občutno večja, kar nakazuje na korelacijo med vrsto malega sesalca in okuženostjo z LCMV.

Večja okuženosti sesalcev prisotnih na divjih odlagališčih je lahko posledica vpliva kar nekaj dejavnikov: a) okoljski dejavnikov, onesnaževanje večja populacijska gostota zaradi prisotnih zanesenih dodatnih virov hrane, b) vpliv imunske oslabiljenosti, saj je gostota populacije večja posledično pa se hitreje prenaša tudi virus in drugi patogeni, ki lahko oslabijo imunski sistem organizmov.

Geografsko nismo zaznali nobenih trendov odstopanj, saj je stopnja okuženosti tako v slovenski kot v hrvaški Istri enaka.

Glede na rezultate lahko sklepamo, da divja odlagališča predstavljajo potencialno nevarnost za zdravje ljudi tudi s stališča mikrobiološkega tveganja. Njihov obstoj v bližini urbanih naselij lahko poveča prenos patogenov iz gostiteljev na človeka.

Zato je nujna njihova sanacija iz vidika javnega zdravja kakor tudi iz naravovarstvenega vidika, saj odlagališča predstavljajo potencialni vir invazivnih vrst, ki so lahko nevarne za avtohtono rastlinstvo in živalstvo.

5 LITERATURA

Andrews M. 1986. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant, Cell & Environment*. 11: 511-519

Avšič-Županc T., Koren S., Drinovec B., Marin J., Poljak M. 2002. Splošna medicinska virologija. 1. izdaja. Ljubljana, Medicinski razgledi

Barton L.L., Mets M.B. 2001. Congenital Lymphocytic Choriomeningitis Virus infection: decade of rediscovery. *Clinical Infectious Diseases*, 33: 370 – 374.

Bizimovska T. Dokaz virusa limfocitnega horiomeningitisa pri malih sesalcih v Sloveniji. 2008. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani.

Bohinc, N., 2006. Onesnaževanje tal. Slovenski kemijski portal.

Bowen MD, Peters CJ, Nichol ST. The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology*. 1996;219:285–90.

Bowen MD, Peters CJ, Nichol ST. Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts. *Mol Phylogenet Evol*. 1997;8:301–16.

Bustin S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 169 – 193.

Bužan Varljen E., Duh D., Pečnikar Fišer Ž., Glasnović P., Ivović V., Kalan K., Maričić P., Zupan S. 2013. Škodljivi vplivi divjih odlagališč na biodiverzitetu in zdravje ljudi. Koper. Univerzitetna založba Annales.

Dalton A.J., Rowe W.P., Smith G.H., Wilsnack R.E., Pugh W.E. 1968. Morphological and cytochemical studies on lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Virology*, 2: 1465 – 1478.

Dobec M., Dzelalija B., Punda-Polic V., Zoric I., High prevalence of antibodies to Lymphocytic choriomeningitis virus in a murine typhus endemic region in Croatia. 2006. *Jour. Of med. Virol.* 78:1643-1647.

Emonet S., Lemasson J.J., Gonzalez J.P., de Lamballerie X., Charrel R.N. 2006. Phylogeny and evolution of old world arenaviruse. *Virology*, 350: 251 – 257.

Emonet S., Retornaz K., Gonzalez J.P., de Lamballerie X., Charrel R.N. 2007. Mouse to human transmission of variant Lymphocytic choriomeningitis virus. *Emerging Infectious Disease*, 13, 3: 472 – 475.

Gonzalez J.P., Emonet S., de Lamballerie X., Charrel R. 2007. Arenaviruses. *CTMI*, 315: 253 – 288.

Kallio-Kokko, H., Laakkonen, J., Rizzoli, A., et al. (2006) Hantavirus and arenavirus antibody prevalence in rodents and humans in Trentino, Northern Italy. *Epidemiol Infect.* 134 (04): 830-6.

Kraus H., Weber A., Appel M., Enders B., Isenberg H.D., Schiefer H.G., Slenczka W., von Graevenitz A., Zahner H. 2003. *Zoonoses, Infectious diseases transmissible from animals to humans*. 3rd edition. Washington DC, ASM Press: 92 – 94.

Kokanović Ž., 2013. Problematika divjih odlagališč odpadkov v okviru projekta Remedisanus, Visoka šola za varstvo okolja. Velenje

Kryštufek B. 1991. *Sesalci Slovenije*. Ljubljana, Prirodoslovni muzej Slovenije

Ledesma J, Fedele C. , Carro F., Lledó L., Paz M. , Sánchez S., Tenorio A, Casimiro Soriguer R., Saz J., Domínguez G., Rosas M., Barandika J., Gegúndez M. 2009. Independent Lineage of Lymphocytic Choriomeningitis Virus in Wood Mice (*Apodemus sylvaticus*), Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 10: 1677-1680

Lledó, L., Genundez, M. I., Saz, J. V., et al. (2003) Lymphocytic choriomeningitis virus infection in a province of Spain: Analysis of sera from the general population and wild rodents. *J Med Virol.* 70: 273-5.

MicrobiologyBytes. www.microbiologybytes.com (datum dostopa: 4.7.2014)

Očistimo Slovenijo za vedno. www.ocistimo.si/Problematika-divjih-odlagalisc.aspx (datum dostopa: 7.6. 2014)

Petres C.J., Buchmeier M., Rollin P.E., Ksiazek T.G. 1996. Arenaviruses. V: *Fields Virology*. 3rd edition. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock R.M., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman R., Straus S.E. (ur.). Philadelphia, PA. Lippincott – Raven Publishers: 1521 – 1551.

Photo gallery wildlife pictures. [www. hlasek.com/apodemus agrarius.html](http://www.hlasek.com/apodemus_agrarius.html) (datum dostopa: 27. 3. 2014)

Photo gallery wildlife pictures. www.hlasek.com/apodemus_flavicolis.html (datum dostopa 27.3.2014)

Photo gallery wildlife pictures. www.hlasek.com/apodemus_sylvaticus.html (datum dostopa: 27. 3. 2014)

Photo gallery wildlife pictures. www.hlasek.com/mus_musculus.html (datum dostopa 2.8.2014)

Plut, D., 1998. Varstvo geografskega okolja. Ljubljana, Filozofska fakulteta, 311.

Problematika divjih odlagališč- Očistimo Slovenijo v enem dnevu. 2010.

Resolucija o nacionalnem varstvu okolja. 2006. Uradni list Republike Slovenije

Salvato M., Clegg JCS., Bowen MD., Buchmeier M.J., Gonzalez J.P., Lukashevich I.S., Peters C.J., Rico – Hesse R., Romanowski V. 2005. Arenaviridae. V: Virus Taxonomy. 8th ICTV Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses.

Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carsten E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle D.R., Wickner R.B. (ur.). New York, Academic: 633 -640 str.

Slovenski kemijski portal. www.kemija.org (datum dostopa: 7. 12. 2013)

Southern P.J. 1996. Arenaviruses. V: Fields Virology. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock R.M., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman R., Straus S.E. (ur.). 3rd edition. Philadelphia, PA, Lippincott-Raven Publishers: 1505 – 1519 str.

Šebenik, I., 1994. Divja odlagališča v osrednjem delu občine Celje–značilnosti, prednostna lista sanacije in način sanacije. Zveza geografskih društev Slovenije, str. 157-174.

Tepina A. Očistimo Slovenijo 2012. 2013. zaključno poročilo. Urednica Karmen Wamberger. - El. knjiga. – Ljubljana. Društvo Ekologi brez meja, 2013

Trkov D. 2012. Mitohondrijski markerji kot metoda za identifikacijo vrst. Zaključno delo. Univerza na Primorskem

Uradni list Republike Slovenije. www.uradni-list.si (datum dostopa: 7.6.2014)

Urata S., Yasuda J., 2012. Molecular mechanism of arenavirus assembly and budding. Viruses, 4: 2049-2079

Uredba o ravnanju z odpadki. 2008. Uradni list Republike Slovenije

Uredba o emisiji snovi pri odvajanju izcedne vode iz odlagališč odpadkov. 2008. Uradni list Republike Slovenije.

Yama, I. N., Cazaux, B., Britton-Davidian, J. (2012) Isolation and characterization of a new strain of lymphocytic choriomeningitis virus from rodents in southwestern France. Vector Borne Zoonotic Dis. 12 (10): 893-903.

PRILOGE

Priloga A: Seznam divjih odlagališč in referenčnih območij, vključenih v raziskavo na področju Istre (povzeto po Bužan in sod., 2013)

	Kraj	Vzorčno mesto // Mjesto uzorkovanja (VM)	Tip habitata*// tip staništa	Država	Površina VM² (m²)
1	Hrastovlje	HR1-kmetija	antropogen	SLO	7423
		HR2-gozd	gozd	SLO	1407
2	Podgorje	odlagališče v gozdu	polnaraven	SLO	4550
3	Rakitovec	rob njive	polnaraven	SLO	502
4	Sv. Anton	sanirano odlagališče	polnaraven	SLO	7119
5	Umag	odlagališče	odlagališče	HR	17151
6	Mirna (Novigrad)	trstičje ob kmetijskih površinah	polnaraven	HR	138117
7 - 9	Istrske Toplice	IT1- odlagališče v gozdu	polnaraven	HR	387
		IT2 – gozd	gozd	HR	1632
		IT3 – košen travnik ob potoku	polnaraven	HR	1243
10	Kaščerga	odlagališče v gozdu	polnaraven	HR	7417
11 - 12	Pazin	1- odlagališče v gozdu	polnaraven	HR	157
		2- odlagališče v gozdu	polnaraven	HR	313
13	Raša	košena jasa ob gozdu	polnaraven	HR	400
14	Pula 1	odlagališče ob naselju	antropogen	HR	22851
15 – 19	Pula 2	1. odlagališče, 1. lokacija ob cesti za Medulin	odlagališče	HR	976
		1. odlagališče, gozd pri smetišču	gozd	HR	2266
		2. odlagališče, 2. lokacija ob cesti za Medulin	odlagališče	HR	4097

		2. odlagališče, drevesa ob cesti	drevesa ob njivi	HR	608
		3. odlagališče, 3. lokacija ob cesti za Medulin	odlagališče	HR	1521
20	Grunj- B1	travnik in nizko grmičevje	polnaraven	HR	12802
21 - 28	Veliki Brion- B2	smetišče za hoteli	odlagališče	HR	150
		Safari park, senik	antropogen	HR	455
		Soline	polnaraven	HR	2183
		Fazanerija	antropogen	HR	671
		Ograda s kozami	antropogen	HR	361
		Ograda s kozami	antropogen	HR	269
		grmičevje ob jezeru	polnaraven	HR	1236
29	Mali Brion- B3	Za oskrbnikovo hišo v gozdu	polnaraven	HR	160
		trdnjava	odlagališče	HR	4587

Priloga B: Tabela analiziranih vzorcev in rezultatov

ŠT	VZOREC DIVA	VRSTA	LOKALITETA	IFA	PCR
1	26	Mus musculus	PULA	-	-
2	27	Mus musculus	PULA	-	-
3	31	Mus musculus	UMAG	+	-
4	32	Apodemus sp.	UMAG	+	-
5	33	Mus musculus	UMAG	-	-
6	34	Apodemus sp.	UMAG	-	-
7	35	Apodemus sp.	UMAG	-	-
8	36	Mus musculus	UMAG	+	-
9	37	Mus musculus	UMAG	-	-
10	39	Apodemus sp.	PODGORJE	-	-
11	40	Apodemus sp.	PODGORJE	-	-
12	41	Crocidura leucodon	PULA	-	-
13	42	Apodemus sylvaticus	PULA	-	-
14	43	Apodemus sylvaticus	PULA	-	-
15	44	Apodemus sylvaticus	PULA	-	-
16	45	Mus musculus	UMAG	-	-
17	46	Apodemus agrarius	UMAG	-	+
18	47	Mus musculus	PULA	+	-
19	49	Mus musculus	PULA	+	-
20	54	Apodemus agrarius	PODGORJE	-	+
21	55	Apodemus sylvaticus	PODGORJE	+	-
22	56	Apodemus sylvaticus	PODGORJE	+	-
23	57	Apodemus sp.	PODGORJE	-	-
24	59	Apodemus sp.	UMAG	-	
25	60	Apodemus sp.	UMAG	-	
26	62	Mus musculus	PODGORJE	-	-
27	68	Mus musculus	PODGORJE	-	-
28	70	Mus musculus	PODGORJE	+	
29	73	Mus musculus	PODGORJE	+	
30	85	Mus musculus	UMAG	+	
31	88	Mus musculus	UMAG	+	
32	91	Mus sp.	PULA	-	-
33	92	Apodemus sp.	PULA	-	-
34	93	Apodemus sp.	PULA	-	-
35	94	Apodemus sp.	PULA	-	-

36	95	Apodemus sp.	PULA	-	+
37	96	Apodemus sp.	PULA	-	+
38	98	Apodemus agrarius	PODGORJE	-	-
39	101	Apodemus sp.	PODGORJE	+	-
40	103	Apodemus sp.	PODGORJE	-	+
41	104	Mus musculus.	SV. ANTON	-	-
42	105	Apodemus sp.	SV. ANTON	-	-
43	106	Apodemus sp.	SV. ANTON	-	-
44	107	Apodemus sp.	SV. ANTON	+	-
45	108	Apodemus sp.	SV. ANTON	-	-
46	109	Apodemus sp.	SV. ANTON	+	-
47	110	Apodemus sp.	SV. ANTON	-	-
48	111	Apodemus sp.	PODGORJE	-	+
49	113	Apodemus sp.	PODGORJE	-	
50	121	Apodemus sp.	SV. ANTON	-	-
51	122	Apodemus sp.	SV. ANTON	+	-
52	124	Apodemus sp.	SV. ANTON	+	-
53	128	Apodemus sp.	SV. ANTON	-	
54	129	Apodemus sp.	SV. ANTON	-	-
55	133	Apodemus sp.	NOVI GRAD	+	
56	134	Mus musculus.	NOVI GRAD	+	
57	135	Apodemus agrarius	NOVI GRAD	-	-
58	140	Apodemus sp.	IS. TOPLICE - C	-	
59	141	Apodemus sp.	IS. TOPLICE - B	-	
60	143	Apodemus sp.	IS. TOPLICE - B	-	
61	144	Apodemus sp.	IS. TOPLICE - B	-	
62	147	Mus musculus	IS. TOPLICE - A	-	
63	148	Apodemus sp.	IS. TOPLICE - C	-	
64	149	Apodemus sp.	IS. TOPLICE - C	-	
65	151	Apodemus sp.	IS. TOPLICE - B	-	
66	152	Apodemus sp.	IS. TOPLICE - B	-	
67	153	Apodemus sp.	IS. TOPLICE - B	-	
68	154	Apodemus agrarius	IS. TOPLICE - B	-	
69	155	Apodemus sp.	IS. TOPLICE - B	-	
70	160	Apodemus sp.	IS. TOPLICE - B	-	
71	161	Apodemus sp.	IS. TOPLICE - B	-	
72	162	Apodemus sp.	IS. TOPLICE - B	+	
73	166	unknown	RAKITOVEC*	-	

74	167	unknown	RAKITOVEC*	-
75	168	unknown	RAKITOVEC*	-
76	169	unknown	RAKITOVEC*	+
77	170	unknown	RAKITOVEC*	-
78	171	unknown	RAKITOVEC*	-
79	172	unknown	RAKITOVEC*	-
80	174	unknown	RAKITOVEC*	-
81	175	unknown	RAKITOVEC*	-
82	176	unknown	RAKITOVEC*	-
83	177	unknown	RAKITOVEC*	-
